

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Aktivitas Enzim Protease dan Profil Protein pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ**

**SKRIPSI**

oleh :

**PRETTY SEPTIANA**  
**145090201111007**



**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2018**

repository.ub.ac.id

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan  
(*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Aktivitas Enzim Protease  
dan Profil Protein pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus  
norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-  
STZ**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh :

**PRETTY SEPTIANA**

**145090201111007**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

# LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Aktivitas Enzim Protease dan Profil Protein pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ**

oleh :

**Pretty Septiana**  
**145090201111007**

17 JUL 2018

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal.....  
 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana  
 Sains dalam bidang kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Rosdiana, M.App.Sc  
 NIP. 19580711 199203 2 002

Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS  
 NIP. 19520412 198002 1 001



Mengetahui,  
 Jurusan Kimia  
 Fakultas Sains Universitas Brawijaya

Masruri, S.Si..M.Si..Ph.D  
 NIP. 19731020 200212 1 001





**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Aktivitas Enzim Protease dan Profil Protein pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ**

**Abstrak**

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolisme yang ditandai dengan meningkatnya kadar glukosa (Hiperglikemia) akibat gangguan sekresi insulin dan atau resistensi insulin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap pankreas tikus Diabetes Melitus. Parameter yang diamati adalah aktivitas protease dan profil protein dari organ pankreas tikus. Pada penelitian ini, tikus putih (*Rattus norvegicus*) di induksi MLD-STZ dosis 20 mg/kgBB selama 5 hari berturut-turut. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) sejumlah 20 ekor dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, kelompok terapi dengan ekstrak etanol akar pletekan menggunakan dosis 250, 375, 500 mg/kgBB secara oral selama 21 hari. Aktivitas protease diukur dengan metode spektrofotometri UV dan analisa profil protein dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar pletekan memberikan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dalam menurunkan aktivitas protease pankreas tikus DM sebesar 52,11% pada dosis terbaik 250 mg/kgBB. Pada hasil analisa profil protein pemberian ekstrak etanol akar pletekan memberikan pengaruh hilangnya protein dengan berat molekul 52 kDa yang muncul pada tikus kontrol positif. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dapat digunakan menurunkan aktivitas protease dan memperbaiki profil protein pada pankreas tikus DM.

Kata kunci : Aktivitas Protease, Diabetes Melitus (DM), Pankreas, Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.), Profil Protein, Streptozotocin.

## **The Influences of Ethanol *Ruellia tuberosa* L. Roots Extract on Protease Activities and Protein Profiles on Pancreas of Rats (*Rattus norvegicus*) Type 1 Diabetes Mellitus due to induction of MLD-STZ**

### **Abstract**

Diabetes mellitus (DM) is a disease with metabolism disorder signed by increasing of blood glucose (*Hyperglycemia*) caused by a disorder of insulin secretion and or insulin resistance. This study aims to determine the influences of ethanol *Ruellia tuberosa* L. roots extract in pancreas Diabetes Mellitus rat. The parameters observed in this study were protease activities and protein profile of diabetic rat's pancreas. In the current work, white rats (*Rattus norvegicus*) were induced with the MLD-STZ dose of 20 mg/kgBW for 5 days successively. White rats (*Rattus norvegicus*) as many as 20 rats which were divided into 5 groups, they were one group of negative control, one group of positive control and three group of therapeutic ethanol *Ruellia tuberosa* L. roots extract with dose 250, 375, 500 mg/kgBW for 21 days. Protease activities were measured by spectrophotometric UV method and protein profile analysis was performed by electrophoresis SDS-PAGE method. The results showed that ethanol extract of *Ruellia tuberosa* L. roots showed a very real difference ( $p < 0,01$ ) to decrease protease activity of rat's pancreas DM equal to 52,11% with the best doses 250 mg/kgBW. Protein profiles showed that ethanol extract of *Ruellia tuberosa* L. roots affected the loss of protein with 52 kDa molecular weight that appeared in positive control rats. Based on this research, it can be concluded that ethanol extract of *Ruellia tuberosa* L. roots can be used to decrease protease activity and repaired protein profile in pancreas of DM rats.

**Keyword:** Diabetes Mellitus (DM), Pancreas, Pletakan ( *Ruellia tuberosa* L.), Protease Activities, Protein profile, *Streptozotocin*.

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah S.W.T yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Aktivitas Enzim Protease dan Profil Protein pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ”** yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, para sahabat dan umatnya hingga akhir zaman.

Penulis menyampaikan terimakasih kepada pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, diantaranya :

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc dan Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing serta Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D, yang telah meluangkan banyak waktu untuk memberikan nasehat dan masukan.
2. Masruri, S.Si.,M.Si.,Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
3. Drs. Mohammad Misbah Khunur, M.Si selaku dosen penasihat akademik yang senantiasa memberikan masukan dan nasihat selama masa studi.
4. Bapak Setiono, Ibu Maslakhah Tunjanah selaku kedua orang tua penulis dan Adik kandung penulis Bima Setyo Aji yang selalu mendoakan, dan memberi semangat serta dukungan moril dan materil.
5. PLP Lab. Biokimia Bapak Maryono yang telah membantu selama penelitian di Lab.Biokimia
6. Rekan Laboratorium Biokimia, antara lain Istoria Rosyada, Siti Sumadyah N., Resti Rachmawanti, Zulfatul Muzayyana, Cindy Alvionita, Ridha Dini R., Ningrum Arrochmah dan Anindia Nurul C.
7. Seluruh Sahabatku Alimah Azmi, Reiza Tri Putri, Niksi Tri Yuliati, Hannisa Triesani M., Melinda Novitasari, Revina

Intan N., Shinta Dwi P., Intan Ayu Saputri, One Grahita D.L  
dan Eka Yuni yang selalu memberikan doa dan semangat.

Akhir kata, semoga penelitian ini bermanfaat bagi penulis  
maupun seluruh pembaca sehingga dapat menambah  
pengetahuan.

Malang, Juli 2018

Penulis





## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b>	iii
<b>ABSTRAK</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>KATA PENGANTAR</b>	vi
<b>DAFTAR ISI</b>	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	x
<b>DAFTAR TABEL</b>	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL</b>	xiii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Diabetes Melitus (DM)	5
2.2 Patogenesis Diabetes Melitus Tipe 1	6
2.3 <i>Streptozotocin</i>	7
2.4 ROS dan Radikal Bebas	7
2.5 <i>Ruellia tuberosa</i> L.	8
2.6 Fitosterol	9
2.7 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> )	11
2.8 Pankreas	12
2.9 Enzim Protease	12
2.10 Penentuan Aktivitas Protease	13
2.11 Penentuan Profil Protein	13
2.12 Hipotesis	14
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Alat dan Bahan	15
3.1.1 Alat	15
3.1.2 Bahan	15

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.3 Tahapan Penelitian	16
3.4 Prosedur Kerja	16
3.4.1.Pembuatan Ekstrak Etanol Akar Pletekan dan Penetapan Dosis Terapi	16
3.4.2.Persiapan Hewan Uji Coba ( <i>Rattus norvegicus</i> )	16
3.4.3.Pengukuran Kadar Glukosa Darah dengan Glukometer	17
3.4.4.Pembuatan Larutan STZ dan Injeksi Intraperitonial pada Hewan Coba	17
3.4.5.Terapi Hewan Coba dengan Ekstrak Etanol Akar Pletekan secara Oral	18
3.4.6.Pembedahan Hewan Coba dan Isolasi Organ Pankreas	18
3.4.7.Isolasi Protease	18
3.4.8.Pembuatan Kurva Baku Tirosin	19
3.4.9.Pengukuran Aktivitas Protease	19
3.4.10.Persiapan Gel Elektroforesis SDS-PAGE	20
3.4.11.Injeksi Sampel, Running, dan Proses Pewarnaan	20
3.4.12.Penentuan Berat Molekul	21
3.4.13.Analisis Data	21

#### **BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1.Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan ( <i>Ruellia tuberosa</i> L.) terhadap Aktivitas Enzim Protease pada Pankreas Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ	23
4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan ( <i>Ruellia tuberosa</i> L.) terhadap Profil Protein pada Pankreas Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ	27

#### **BAB V. PENUTUP**

5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31

#### **DAFTAR PUSTAKA**

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Struktur <i>Streptozotocin</i>	7
Gambar 2.2 Tanaman <i>Ruellia tuberosa</i> L.	9
Gambar 2.3 Struktur (a) $\beta$ -sitosterol, (b) Stigmasterol, (c) Kampesterol	10
Gambar 2.4 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> )	11
Gambar 4.1 Dugaan mekanisme reaksi senyawa fitosterol dalam meredam radikal	26
Gambar 4.2 Profil pita protein pankreas tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) dengan metode elektroforesis SDS- PAGE	29



## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Aktivitas protease tikus kelompok negatif, positif, terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB	24
Tabel 4.2	Berat molekul protein hasil isolasi organ pankreas tikus kelompok negatif, positif, terapi 250 mg/kgBB, 375 kg/mgBB dan 500 mg/kgBB	28



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran A. Persetujuan Laik Etik	39
Lampiran B. Surat Determinasi	40
Lampiran C. Skema Kerja Penelitian Secara Umum	41
Lampiran D. Preparasi Larutan dan Perhitungan	42
Lampiran E. Uji Antioksidan	45
Lampiran F. Identifikasi dengan LCMS	46
Lampiran G. Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus	46
Lampiran H. Pengukuran Kurva Baku Tirosin	47
Lampiran I. Pembuatan Kurva Baku Tirosin	48
Lampiran J. Pengukuran Aktivitas Protease	49
Lampiran K. Hasil Uji Statistik	53
Lampiran L. Penentuan Berat Molekul	55



## DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

### Singkatan

ADP	(Adenosin Posfat)
ANOVA	(Analysis of Variance)
APS	(Ammonium Persulfat)
ATP	(Adenosin Tri Posfat)
BNJ	(Beda Nyata Jujur)
DM	(Diabetes Melitus)
DMG	(Diabetes Melitus Gestational)
DNA	(Deoxyribose-nucleic Acid)
GLUT 2	(Glucose Transporters 2)
GLUT 4	(Glucose Transporters 4)
HPX	(Hemopexin)
HSP	(Heat Shock Protein)
IL-1	(Interleukin-1)
IL-6	(Interleukin-6)
IL-8	(Interleukin-8)
IP	(Intraperitoneal)
kDa	(Kilodalton)
LADA	(Latent Autoimmune of Diabetes in Adult)
LCMS	(Liquid Chromatography Mass Spectrometry)
LGB	(Lower Gel Buffer)
LPO	(Laktoperoksidase)
MLD	(Multiple Low Dose)
NAD <sup>+</sup>	(Nikotinamida AdeninDinukleotida)
Nf-kB	(Nuclear Factor-kappaB)
NO	(Nitrogen Monoksida)
PBS	(Phosphate Buffer Saline)
PMSF	(Poly Methyl Sulfonil Fluoride)
Rf	(Retardation Factor)
ROS	(Reactive Oxygen Species)
RSB	(Reducing Sample Buffer)
SDS-PAGE	(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SOD	(Superoksida Dismutase)
STZ	(Streptozotocin)

TCA	(Tri Chloro Asetate)
TEMED	(Tetramethyl Ethylene Diamine)
TNF- $\alpha$	(Tumor Necrosis Factor-Alpha)
UGB	(Upper Gel Buffer)
UV	(Ultraviolet)
WHO	(World Health Organization)

### **Simbol**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\lambda$	Lamda
$\mu\text{L}$	Micro Liter
mL	Mili Liter



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolik menahun yang menjadi permasalahan serius di Indonesia karena diperkirakan jumlah penderita DM akan terus meningkat setiap tahunnya [1]. Berdasarkan data statistik WHO mengenai jumlah penderita diabetes pada tahun 2000 dan proyeksi jumlah penderita diabetes dunia pada tahun 2030, Indonesia menduduki tempat ke 4 terbesar dengan pertumbuhan sebesar 152% atau dari 8.426.000 orang pada tahun 2.000 menjadi 21.257.000 orang di tahun 2030 [2].

Diabetes Melitus disebabkan oleh kegagalan sel  $\beta$ -pankreas pada sekresi insulin, keadaan sel tubuh tidak merespon kerja dari insulin (resistensi insulin) atau kombinasi keduanya [3]. DM tipe 1 disebut dengan *Insulin Dependent Diabetes*, sistem imun tubuh menyerang dan merusak sel  $\beta$  pankreas sehingga terjadi kegagalan  $\beta$  pankreas menyebabkan insulin yang dihasilkan tidak dalam jumlah yang cukup. Penyakit DM tipe 1 sering diderita oleh anak-anak tetapi tidak menutup kemungkinan untuk orang dewasa [4]. Kerusakan sel  $\beta$  pankreas dapat diakibatkan oleh infeksi virus, secara genetik (*wolfram syndrome*) atau pemberian senyawa toksik (*streptozotocin*, aloksan) [5].

STZ dapat menginduksi kerusakan sel  $\beta$  pankreas karena bertindak sebagai donor Nitrogen Oksida (NO) yang memicu peningkatan beberapa spesies oksigen reaktif (ROS) diantaranya meningkatkan radikal hidroksil ( $\text{OH}\cdot$ ), radikal superoksida ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), dan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Radikal NO dalam bentuk bebas maupun dalam bentuk senyawa bersifat sangat toksik karena menyebabkan kerusakan DNA pankreas [6]. ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif karena oksidan dalam tubuh lebih banyak daripada antioksidan dan dapat memperparah kerusakan sel  $\beta$  pankreas [7]. Kerusakan sel  $\beta$  pankreas mengakibatkan terjadinya hiperglikemia. Hiperglikemia dapat menyebabkan penumpukan glukosa pada sel atau jaringan sehingga terjadi inflamasi. Inflamasi memicu peningkatan aktivitas enzim protease yang menyebabkan



penyerangan protein sehingga terjadi kerusakan protein. Kerusakan pada protein dapat diamati melalui profil pita protein [8].

Pengembangan penelitian tanaman yang berpotensi sebagai obat diabetes dalam upaya pencegahan dan pengobatan sangat diperlukan. Masyarakat Indonesia telah lama mengenal serta menggunakan obat-obatan alami atau yang dikenal dengan obat herbal. Obat herbal lebih mudah diterima oleh masyarakat karena selain telah akrab dengan masyarakat, obat ini lebih murah dan mudah didapat [9]. Salah satu tanaman obat yang banyak ditemukan di Indonesia yaitu tanaman *Ruellia tuberosa* L. atau yang lebih dikenal sebagai tanaman pletekan. Tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) secara ilmiah dapat digunakan sebagai tanaman herbal antidiabetik, diuretik, antipiretik, analgesik, anti-hipersensitif dan antioksidan. Karena senyawa bioaktif yang terkandung pada tanaman tersebut [10]. Akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) mengandung berbagai senyawa bioaktif salah satu nya adalah fitosterol. Senyawa tersebut dapat larut dalam pelarut organik yang bersifat polar karena sifat dari senyawa tersebut adalah polar, sehingga ekstraksi dapat menggunakan pelarut etanol [11].

Sehubungan dengan uraian diatas,maka dalam penelitian ini akan dipelajari potensi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dalam menurunkan kadar glukosa pada Diabetes Melitus serta sebagai antioksidan untuk memperbaiki aktivitas enzim protease dan profil protein pada pankreas.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dirumuskan beberapa permasalahan dalam penelitian ini :

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. terhadap aktivitas enzim protease pada pankreas tikus model DM 1 akibat induksi MLD-STZ?
2. Bagaimana profil protein pankreas tikus model DM 1 akibat induksi MLD-STZ setelah pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L.?

### 1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus novvergicus*) strain wistar usia 2 bulan dengan berat badan rata-rata 200 g sebanyak 20 ekor. Penggunaan hewan coba menyertakan sertifikat laik etik No 873-KEP-UB dari komisi etik penelitian UB.
2. Dosis MLD-STZ yang digunakan adalah 20 mg/kg berat badan tikus per hari selama 5 hari berturut-turut. Tikus dianggap mengalami diabetes apabila kadar gula darah melebihi 200 mg/dL [12].
3. Terapi ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. dengan 3 dosis yaitu 250, 375 dan 500 mg/ kgBB yang diberikan pada hewan coba sebanyak 1 x 3 mL sehari secara oral (sonde) selama 21 hari
4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah aktivitas enzim protease yang diukur dengan metode spektrofotometri UV, dan profil protein pankreas tikus yang diukur dengan metode elektroforesis SDS-PAGE

### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Mempelajari pengaruh pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. terhadap aktivitas enzim protease pada pankreas tikus model DM 1 akibat induksi MLD-STZ
2. Mengetahui profil protein pankreas tikus model DM 1 akibat induksi MLD-STZ setelah pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait potensi ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. sebagai tanaman antidiabetik. Sehingga dapat digunakan sebagai dasar pembuatan obat herbal alternatif untuk menurunkan kadar glukosa dalam darah pada penderita Diabetes Melitus.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Melitus (DM)

Diabetes merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat gangguan kerja hormon insulin, maupun sekresi insulin oleh sel  $\beta$  pankreas. Hiperglikemia kronis pada diabetes terjadi dalam jangka waktu yang panjang dapat menyebabkan kegagalan pada organ tubuh terutama pada mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh. Diabetes Melitus dapat dibagi menjadi DM tipe 1, DM tipe 2, diabetes gestasional dan diabetes melitus tipe khusus. Sebagian besar kasus DM terbagi dalam dua kategori *etiopatogenetik*. Kategori pertama yaitu DM tipe 1 atau *insulin-dependt diabetes mellitus* dan kategori kedua yaitu DM tipe 2 atau *non-insulin dependt diabetes mellitus* [13].

DM tipe 1 terjadi karena kerusakan autoimun sel  $\beta$  pankreas menyebabkan kekurangan sekresi insulin yang berakibat pada gangguan metabolik. Sehingga kadar glukosa dalam darah meningkat. Selain itu pada DM 1 sel  $\alpha$ -pankreas menjadi abnormal menyebabkan sekresi glukagon yang berlebihan [14]. Proses kegagalan sel- $\beta$  (*cell- $\beta$  failure*) dapat disebabkan oleh stres, glukotoksisitas dan lippotoksisitas sehingga produksi insulin menurun dan kadar glukosa dalam darah meningkat (hiperglikemia) [15].

DM Tipe 2 adalah penyakit gangguan metabolik yang ditandai oleh kenaikan gula darah akibat insulin resisten yaitu suatu kondisi dimana sel dalam tubuh tidak dapat menggunakan insulin dengan baik. DM 2 disebabkan kombinasi faktor genetik yang terkait gangguan sekresi insulin, resistensi insulin dan faktor lingkungan seperti obesitas, makanan, stres, penuaan dan pola hidup yang tidak sehat [14].

Diabetes Melitus Gestasional (DMG) adalah keadaan pada seorang wanita yang mengalami kenaikan kadar glukosa tinggi selama kehamilan. DMG merupakan gangguan toleransi glukosa yang pertama kali ditemukan pada saat kehamilan. Tubuh mengalami peningkatan resistensi insulin tiga kali lipat selama kehamilan dibandingkan dengan keadaan tidak hamil dan dapat hilang saat proses persalinan selesai [16]. Diabetes tipe khusus merupakan

diabetes yang jarang ditemukan dapat disebabkan karena cacat genetik dari sel  $\beta$  pankreas, cacat genetik pada kerja insulin, penyakit pankreas, atau karena obat-obatan tertentu [13].

Gejala diabetes melitus dibedakan menjadi dua yaitu akut dan kronik. Gejala akut diabetes melitus meliputi sering kencing (*polyuria*), banyak makan (*polyphagia*), dan banyak minum (*polydipsia*). Sedangkan untuk gejala kronik meliputi kelelahan, kesemutan, pandangan kabur, mudah mengantuk, kulit seperti tertusuk jarum dan pada ibu hamil dapat menyebabkan keguguran kehamilan [17].

## 2.2 Patogenesis Diabetes Melitus Tipe 1

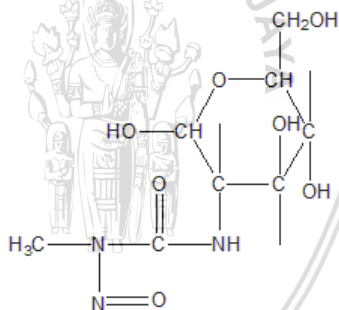
Diabetes Melitus tipe 1 adalah kelainan yang disebabkan kerusakan autoimun dari sel pankreas yang mempengaruhi sekresi insulin. Penyakit ini paling sering didiagnosis pada anak-anak dan remaja. Namun, penyakit autoimun ini juga dapat terjadi pada dewasa dengan tingkat ringan yang disebut LADA (*Latent autoimmune of Diabetes in Adults*) biasanya disertai dengan tiga gejala klasik yaitu polidipsia, polifagia, poliuria [18].

Patogenesis DM tipe 1 berkembang sebagai akibat dari faktor genetik, lingkungan, dan faktor imunologi yang menyebabkan kerusakan sel  $\beta$  pankreas. Individu secara genetik dengan jumlah sel  $\beta$  pankreas tetap rentan terpapar lingkungan, sehingga sel-sel inflamatori menginduksi autoimunitas sel  $\beta$ . Proses ini, ditandai sel islet reaktif terhadap antibodi, dan dengan pengaktifan autoreaktif sel T yang mampu menghancurkan sel  $\beta$ . Gejala DM tipe 1 tidak akan muncul pada seorang individu hingga >80% - 90% sel  $\beta$  pankreas. Penghancuran sel  $\beta$  pankreas berpengaruh pada penurunan sekresi insulin [18].

Insulin merupakan hormon yang disintesis pada sel  $\beta$  pankreas yang memiliki banyak fungsi penting dalam tubuh. Insulin memiliki struktur polipeptida. Insulin dapat mengikat reseptor di permukaan sel. Reseptor terletak pada membran sel saling mengikat satu sama lain dengan ikatan disulfida dan terdiri dari empat sub unit. Dua dari sub unit, terletak di permukaan sel membran, bernama beta, dua sub unit terletak di luar permukaan sel yang diberi nama alpha. Hormon insulin akan disekresikan oleh sel  $\beta$  ketika terjadi peningkatan kadar gula dalam darah [19].

### 2.3 Streptozotocin

*Streptozotocin* (2-deoksi-2-[3-metil-3-nitrosourea] 1-D glukopiran) (**Gambar 2.1**) memiliki dua bentuk yaitu  $\alpha$  dan  $\beta$ . Berwujud bubuk kristal kuning atau putih pucat dengan berat molekul 265 g/mol, rumus molekul  $C_8H_{15}N_3O_7$ . *Streptozotocin* adalah senyawa diabetogenik permanen, diproduksi oleh bakteri gram positif *Streptomyces achromogenes*. STZ digunakan menginduksi diabetes melitus pada hewan laboratorium dengan penghambatan sekresi dan sintesis insulin yang diproduksi oleh sel  $\beta$  pankreas. STZ bertindak sebagai donor Nitrogen Oksida (NO) yang menyebabkan peningkatan ROS. *Streptozotocin* adalah sejenis glukosa toksik yang secara khusus terakumulasi dalam sel beta pankreas melalui transporter glukosa GLUT2 dengan afinitas rendah. Mekanisme efektor beracun dari STZ dimulai dengan produk yang terdekomposisi dan terbentuknya radikal bebas, yang menyebabkan kerusakan DNA sel  $\beta$  pankreas akibat alkilasi sehingga mengganggu sistem mitokondria dan menghambat *O-GlcNAcase* [20].



**Gambar 2.1** Struktur *Streptozotocin*

### 2.4 ROS dan Radikal Bebas

ROS merupakan molekul oksidan relatif tinggi, bersifat reaktif atau sangat tidak stabil sehingga cepat bereaksi dengan molekul lain [21]. Tubuh secara fisiologis dapat menghasilkan ROS (radikal bebas atau oksidan), sumber penghasil ROS diantaranya fagosit, mitokondria, peroksisime, xantin oksidase dan sebagainya [22]. ROS dapat dihasilkan dari faktor luar seperti radiasi ultraviolet, konsumsi alkohol, asap rokok, polutan, radiasi, senyawa beracun, makanan dan lainnya [23]. Radikal bebas merupakan suatu atom yang memiliki

elektron bebas tidak berpasangan. Rasio antara radikal bebas lebih besar daripada antioksidan maka akan terjadi stres oksidatif [21].

Reaktivitas ROS radikal bebas dapat merusak komponen tubuh misalnya DNA, protein dan lipid penyusun sel. Kadar ROS tinggi dalam tubuh dapat diketahui melalui rendahnya aktivitas SOD, katalase, glutathion peroksidase dan kadar vitamin C, E serta  $\beta$  karoten. Molekul protein yang teroksidasi baik berupa enzim yang tidak teraktivasi ataupun protein yang tidak terpolarisasi akan menyebabkan reaksi inflamasi [24]. Inflamasi adalah suatu respon terhadap kerusakan jaringan dan infeksi. Proses inflamasi merupakan suatu mekanisme perlindungan tubuh dengan cara menetralkan dan memusnahkan agen-agen yang berbahaya untuk perbaikan jaringan [23].

## 2.5 *Ruellia tuberosa* L.

Tanaman *Ruellia tuberosa* L. (**Gambar 2.2**) secara taksonomi memiliki klasifikasi sebagai berikut [25]:

Kerajaan	: Plantae
Subkerajaan	: Tracheobionta
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Solanales
Suku	: Acanthaceae
Marga	: Ruellia
Jenis	: <i>Ruellia tuberosa</i> L.

*Ruellia tuberosa* L. (*Acanthaceae*) adalah tanaman tropis dan tersebar luas di Asia Tenggara. Dalam pengobatan, *Ruellia tuberosa* L. digunakan sebagai antidiabetes, antioksidan, antipiretik, analgesik, dan agen antidotal. *Ruellia tuberosa* L. merupakan tanaman perennial (tanaman yang hidup lebih dari dua tahun) dengan tinggi 60-70 cm, dengan batang segiempat berbulu. Akarnya ramping, memanjang. Daun dengan tangkai daun sampai 2 cm bunga berwarna biru-violet mencolok. Tanaman ini diperbanyak melalui biji [26].

Masing-masing bagian tanaman *Ruellia tuberosa* L. memiliki kandungan senyawa bioaktif. Daun mengandung apigenin dan luteolin, sedangkan bunga mengandung malvidin 3-5-diglukosida dalam jumlah yang cukup. Kuncup bunga terkandung proporsi maksimum flavonoid (3% apigenin-7-O-glucoronide dan

flavon ). Hasil minyak biji mengandung asam myristic, capric dan lauric. Umbi akar tanaman mengandung n-alkana, triterpenoid dan fitosterol [26].



**Gambar 2.2** Tanaman *Ruellia tuberosa* L.

Terdapat 25 komponen terdeteksi dalam ekstrak etanol pada bagian akar *Ruellia tuberosa* L. Komponen tersebut yakni Lupeol (68,14%), Stigmasterol (8,89%), Usosterol (3,99%), Sukrosa (2,24%), 3-bromo-Cholest-5-ene, (3 $\alpha$ - (2,24%), 2-metil-oktadekana (2,10%), 2-metil-nonadekana, (1,93%), 2-metil-eikosana (1,79%) dan Heptakosana (1,43%). Senyawa-senyawa tersebut ditemukan sebagai senyawa utama pada ekstrak etanol bagian akar pada tanaman *Ruellia tuberosa* L. [27].

## 2.6 Fitosterol

Fitosterol (**Gambar 2.3**) termasuk dalam senyawa metabolit sekunder, yang memiliki struktur mirip dengan kolesterol namun fitosterol mengandung gugus etil pada rantai cabang. Fitosterol tersusun dari 28 - 30 atom. Fitosterol memiliki rangka struktur steroid dengan gugus hidroksil yang menempel pada C-3 dari cincin A, dan rantai alifatik pada atom C-17 dari cincin D. Tiga macam senyawa yang biasa disebut sebagai "fitosterol" yaitu  $\beta$ -sitosterol (atau biasa disebut dengan sitosterol), stigmasterol dan kampesterol. Bahan alam yang mengandung senyawa fitosterol telah banyak di









dari tikus betina. Panjang mulai dari hidung sampai ekor rata-rata mencapai 400 mm. Panjang ekor sekitar 150 -215 mm. Memiliki telinga relatif kecil dan mata yang berwarna merah. Waktu hidup tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah 2,5 – 3,5 tahun. Berikut adalah taksonomi dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) [31,32]:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Wistar

## 2.8 Pankreas

Pankreas adalah organ yang berbentuk panjang dan meruncing berwarna merah kecokelatan, terletak pada bagian belakang perut. Sisi kanan disebut sebagai kepala yang merupakan bagian terluas terletak pada kurva duodenum, bagian pertama dari usus halus. Sisi kiri sebagai badan pankreas berbentuk meruncing dan melebar ke atas dan bagian ekornya berakhir di dekat limpa [33,34]. Pankreas terdiri dari 2 jenis kelenjar yaitu eksokrin dan endokrin. Kelenjar eksokrin mengeluarkan enzim pencernaan. Kelenjar endokrin terdiri dari pulau *Langerhans* yang berfungsi mengeluarkan hormon ke dalam aliran darah [34].

Enzim yang disekresikan oleh kelenjar eksokrin di pankreas membantu memecah karbohidrat, lemak, protein, dan asam dalam duodenum. Pankreas berhubungan dengan penyakit diabetes melitus berkaitan dengan hormon yang dihasilkan pankreas. Hormon utama yang disekresikan oleh kelenjar endokrin di pankreas adalah insulin dan glukagon. Kedua hormon tersebut mengatur kadar glukosa dalam darah [35,36]

## 2.9 Enzim Protease

Protease adalah enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis ikatan peptida dari senyawa-senyawa protein dan diurai menjadi senyawa yang lebih sederhana (asam amino) [37]. Protease merupakan salah satu enzim yang berperan dalam proses fagositosis

terhadap benda asing dalam tubuh [38]. Enzim protease berperan dalam fungsi fisiologi seperti respon imun dan inflamasi. Inflamasi dapat menyebabkan kerusakan jaringan akibat aktivitas protease yang tidak terkendali [39].

Jaringan yang mengalami inflamasi akan meningkatkan jumlah protease menyebabkan aktivitas protease berlebihan sehingga mengakibatkan kerusakan sel. Kerusakan sel akan menimbulkan respon inflamasi. Sel inflamasi seperti makrofag, sel mast dan eosinofil akan teraktivasi sebagai akibat dari respon imun tubuh terhadap antigen. Makrofag bekerja melisiskan sel yang mati dalam fagolisosom. Mediator inflamasi berupa sitokin interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), dan interleukin 8 (IL-8) akan dilepaskan sebagai akibat makrofag yang teraktivasi. Sitokin IL-8 akan mengaktivasi neutrophil yang bersifat kemotaksis. Peningkatan aktivitas protease dapat digunakan sebagai indikasi adanya inflamasi [40].

## 2.10 Penentuan Aktivitas Protease

Aktivitas enzim tidak dapat dilihat secara kasat mata karena tergolong dalam reaksi yang bersifat mikro. Aktivitas enzim dapat diuji dengan menggunakan beberapa metode bergantung pada substrat enzim tersebut. Substrat yang sesuai untuk enzim protease, yaitu substrat kasein yang berupa molekul protein [41]

Pada prinsipnya uji ini diperlukan blanko yang dibuat dari penambahan kasein dan buffer pH optimum yang kemudian diinkubasi dan ditambahkan TCA serta protease. Penambahan TCA akan menyebabkan kasein terdenaturasi akibat terbentuknya suasana asam dan membentuk kompleks berwarna putih. Kasein yang memiliki berat jenis besar akan mengendap, dimana kemudian tirosin, enzim, dan buffer akan terdapat pada supernatan. Supernatan inilah yang kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 278 nm melalui spektrofotometri. Panjang gelombang 278 nm merupakan serapan maksimum dari tirosin. Jumlah tirosin hasil hidrolisis dari kasein digunakan untuk menentukan aktivitas protease [41]

## 2.11 Penentuan Profil Protein

Induksi zat toksik pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) mampu memicu produksi ROS yang berlebih. Peningkatan ROS yang

berlebih, secara tidak langsung juga memicu peningkatan aktivitas enzim protease yang berlebih sehingga mampu merusak kerja suatu organ melalui inflamasi. dan dapat menyebabkan perubahan profil pita protein. Perubahan profil pita protein dapat diamati dengan metode elektroforesis SDS-PAGE [38].

Elektroforesis protein dapat dilakukan dibawah kondisi non denaturasi atau kondisi terdenaturasi. Elektroforesis SDS-PAGE adalah elektroforesis dibawah kondisi terdenaturasi [42]. SDS-PAGE atau *Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamida Gel elektroforesis* merupakan suatu metode analisis profil protein yang umum digunakan. Metode ini digunakan untuk memantau pemurnian protein yang didasarkan pada pemisahan protein bermuatan berdasarkan berat molekulnya sehingga dapat menentukan massa molekul relatif suatu protein. SDS ( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$ ) adalah suatu deterjen ionik yang dapat mendenaturasi protein karena mampu melarutkan molekul yang bersifat hidrofobik menyebabkan seluruh protein bermuatan negatif. Protein bermuatan negatif akan menuju anoda yang bermuatan positif selama SDS-PAGE berlangsung [43]. Teknik SDS-PAGE telah terbukti mampu mendeteksi fraksi protein dalam konsentrasi kecil [44].

## 2.12 Hipotesis

1. Pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. dapat menurunkan aktivitas enzim protease pada pankreas tikus model Diabetes Melitus tipe 1 akibat induksi MLD-STZ
2. Pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. mampu memperbaiki profil protein pada pankreas tikus model Diabetes Melitus tipe 1 akibat induksi MLD-STZ

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Alat dan Bahan

##### 3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat bak pemeliharaan tikus, seperangkat alat bedah, seperangkat alat sentrifugasi, seperangkat alat elektroforesis, seperangkat alat gelas (pipet tetes, tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 10 mL, labu takar 10 mL dan 100 mL, corong gelas, spatula, gelas kimia 100 mL, gelas arloji), botol semprot, *magnetic stirrer*, lemari pendingin, neraca analitik, penangas air, kertas saring, rak tabung reaksi, mikro pipet, pestle, mortar, jarum sonde, tabung polipropilen, *rotary evaporator*, *vortex*, inkubator, glukometer digital (Easy Touch GPU), GlucoDr™ test strip, *blood lancet*, *blood strip*, *microtube*, spuit, aluminium foil, spektrofotometri UV, masker, dan sarung tangan.

##### 3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah 900 g akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) yang diperoleh dari Materia Medika Batu Malang, sampel pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*), etanol absolut, aquades, NaCl 10 %, asam sulfat, asam asetat, *streptozotocin* (STZ), pasir kuarsa, larutan kasein 500 ppm, larutan buffer fosfat pH 7, 0.1 M larutan buffer sitrat pH 4.5, acryl, larutan TCA 4%, alkohol 70%, larutan baku tirosin 20 ppm, larutan *staining*, larutan *destaining*, larutan NaCl-fisiologis 0,9%, larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*), SDS 10%, Tris HCl pH 8,8, larutan *Reducing Sample Buffer* (RSB), *Ammonium Persulfate* (APS), *Tetramethyl Ethylene Diamine* (TEMED), dan protein standar marker.

#### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian berlangsung pada bulan Februari - Juni 2018.

### 3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu:

1. Pembuatan ekstrak etanol akar pletekan dan penetapan dosis terapi
2. Persiapan hewan coba (tikus putih *Rattus novergicus*)
3. Pengukuran kadar glukosa darah dengan glukometer
4. Pembuatan larutan *Streptozotocin* (STZ) dan injeksi intraperitoneal (IP) pada hewan coba.
5. Terapi hewan coba kelompok DM dengan menggunakan ekstrak etanol akar pletekan
6. Pembedahan hewan coba dan isolasi organ pankreas
7. Isolasi protease
8. Pembuatan kurva baku tirosin
9. Pengukuran aktivitas protease
10. Persiapan gel elektroforesis SDS-PAGE
11. Injeksi sampel, *running* elektroforesis SDS-PAGE, dan proses pewarnaan
12. Penentuan berat molekul
13. Analisis data

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Akar Pletekan dan Penetapan Dosis Terapi

Ditimbang serbuk akar pletekan 900 g yang berukuran 90 mesh. Serbuk akar pletekan dimaserasi dengan pelarut etanol : aquades (1:1) sebanyak 3L. Didiamkan 1x24 jam kemudian dilakukan penyaringan, filtrat yang berupa ekstrak cair diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 50 °C dengan kecepatan 120 rpm hingga diperoleh ekstrak kental. Residu pelarut ditampung dan digunakan maserasi kembali. Maserasi dan evaporasi dilakukan berulang sampai 3x. Ekstrak pekat yang didapat dilarutkan dalam aquades dan dimasukkan ke lambung tikus secara oral sebanyak 3 mL. Dosis terapi yang digunakan adalah 250, 375 dan 500 mg/kgBB.

#### 3.4.2 Persiapan Hewan Uji Coba ( *Rattus norvegicus* )

Hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan berjumlah 20 ekor dengan berat badan masing-masing  $\pm 200$  g dan

berusia  $\pm$  2 bulan diperoleh dari Biosains, Universitas Brawijaya. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok I tikus normal, kelompok II tikus (+) DM, kelompok III tikus (+) DM terapi dengan dosis terapi 250 mg/kgBB, kelompok IV tikus (+) DM terapi dengan dosis terapi 375 mg/kgBB, dan kelompok V tikus (+) DM terapi dengan dosis terapi 500 mg/kgBB. Tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus, hewan uji diaklimatisasi selama 1 minggu di Laboratorium Hewan Biosains.

### 3.4.3 Pengukuran Kadar Glukosa Darah dengan Glukometer

Pengukuran dilakukan dengan cara mula-mula ujung ekor tikus diusapkan alkohol 70%, kemudian ditusuk dengan *blood lancet*. Darah tikus yang keluar kemudian dimasukkan kedalam ujung *blood strip* yang telah terhubung dengan glukometer dan ditunggu hasil yang tertera pada layar glukometer. Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan pada kelima kelompok perlakuan. Pada kontrol negatif, pengukuran kadar glukosa dilakukan setelah aklimatisasi. Pada kelompok positif DM pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum injeksi STZ, dan setelah inkubasi. Pengukuran kadar glukosa pada kelompok terapi dilakukan saat sebelum injeksi STZ, setelah injeksi dan setelah terapi ekstrak.

### 3.4.4 Pembuatan Larutan STZ dan Injeksi Intraperitoneal pada Hewan Coba

Serbuk STZ ditimbang 325,9 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 4,9 mL buffer sitrat 0.1 M pH 4.5 dan di *vortex* hingga semua serbuk STZ larut. Selanjutnya larutan STZ yang digunakan stok dan injeksi disimpan dalam temperatur 4 °C. Volume STZ yang digunakan untuk injeksi disesuaikan dengan berat badan tikus. Selama 5 hari berturut-turut diinjeksikan secara IP dengan dosis yang digunakan yakni 20 mg/kgBB. Hewan diposisikan menghadap ke arah frontal hingga terlihat abdomennya. Disemprotkan alkohol 70% pada bagian atas abdomen kemudian kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya. Lalu ditusukkan jarum suntik dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka jarum suntik telah masuk pada area intraperitoneal. Selanjutnya dimasukkan STZ secara perlahan dan abdomen tikus disemprot kembali dengan alkohol 70%. Tikus yang telah diinjeksi STZ diinkubasi selama 7

hari dan dilakukan pengecekan kadar gula darah setiap 7 hari sekali. Tikus positif DM di tandai dengan kadar glukosa  $\geq 200$  mg/dL.

#### **3.4.5 Terapi Hewan Coba dengan Ekstrak Etanol Akar Pletekan secara Oral**

Dilakukan terapi dengan ekstrak etanol pada 3 kelompok tikus (+) DM terapi dengan dosis yang digunakan adalah 250, 375 dan 500 mg/kgBB. Masing-masing tikus yang di terapi melalui oral (sonde). Ekstrak pekat dilarutkan dalam aquades. Banyaknya (mg) ekstrak yang diambil untuk dilarutkan dalam aquades didasarkan pada berat badan tikus. Terapi dilakukan 1x3 mL sehari selama 21 hari secara oral. Setiap 7 hari sekali dilakukan pengecekan kadar glukosa darah dengan glukometer.

#### **3.4.6 Pembedahan Hewan Coba dan Isolasi Organ Pankreas**

Skalpel dan alat bedah disiapkan untuk membantu mengambil organ pankreas. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dibunuh dengan dislokasi leher. Setelah mati, tikus diletakkan pada nampan bedah dan ditata pada posisi ventral diatas. Dilakukan penyobekan pada daerah inguinal membentuk huruf V menggunakan gunting bedah. Diambil pankreas yang terletak pada daerah hulu lambung dan diantara usus halus. Organ yang telah diambil dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% dan disimpan dalam larutan PBS azida dalam lemari pendingin.

#### **3.4.7 Isolasi Protease**

Organ pankreas ditimbang 0,5 g dengan neraca analitik, lalu digerus hingga halus diatas mortar dingin dengan penambahan sedikit pasir kuarsa. Kemudian ditambahkan larutan PBS Tween:PMSF (9:1) sebanyak 3x volume sampel dan digerus kembali. Lalu dipindahkan kedalam tabung mikrotub dan disonikasi selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Diambil supernatan dan ditambah dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Kemudian disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada temperatur 4 °C. Endapan yang terbentuk diambil, lalu dikeringkan hingga bau etanol tidak tercium. Endapan yang telah kering



ditambahkan larutan buffer Tris-16 HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 lalu dilakukan homogenasi, sehingga didapatkan isolat protein mengendap pada bagian bawah tabung polipropilen

### 3.4.8 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Tahapan yang perlu dilakukan untuk membuat kurva baku tirosin diantaranya adalah 6 mL larutan baku tirosin 500 ppm dimasukkan ke labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga mencapai tanda batas. Didapatkan larutan baku tirosin 20 ppm. Kemudian dibuat larutan baku tirosin konsentrasi 5,10,15,20,25 dan 30 ppm. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada  $\lambda$  maksimum 275 nm. Pengukuran blanko menggunakan buffer fosfat.

### 3.4.9 Pengukuran Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas protease hasil isolasi protease dari pankreas tikus dilakukan dengan langkah pertama yang dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 100  $\mu$ L, 150  $\mu$ L larutan buffer fosfat pH 0,1, dan 50  $\mu$ L enzim protease lalu diinkubasi selama 60 menit pada temperatur 37 °C. Setelah itu ditambahkan 200  $\mu$ L larutan TCA 4% dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 27 °C (temperatur ruang). Selanjutnya, disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian diambil 400  $\mu$ L dan diencerkan 3 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada  $\lambda$  maks tirosin sebesar 275 nm, untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Pengukuran aktivitas enzim protease didasarkan pada metode Walter

(1984) dengan rumus: 
$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Dimana: v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim

### 3.4.10 Persiapan Gel Elektroforesis SDS-PAGE

Mula-mula dilakukan yaitu membuat plat gel dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat  $\pm 1$  mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*Stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*Separating gel*). Pembuatan *stacking gel* dibuat dengan mencampurkan 0,45 mL Acryl, 2,11 mL aquades, 0,38 mL Tris HCl pH 8,8, 30  $\mu$ L *ammonium persulphate* (APS) 10 %, 30  $\mu$ L SDS 10% dan 5  $\mu$ L *tetramethyl ethylene diamine* (TEMED) menjadi satu. Sedangkan pembuatan *Stacking gel* dilakukan dengan mencampurkan 3,125 mL Acryl, 2,75 mL Tris HCl pH 8,8, aquades 1,505 mL, APS 10 % 75  $\mu$ L, SDS 10 % 75  $\mu$ L dan TEMED 6,25  $\mu$ L menjadi satu. Kemudian campuran larutan *separating gel* tersebut dimasukkan kedalam tempat lapisan gel menggunakan mikropipet dan dibiarkan selama 10-30 menit hingga terbentuk gel. Selanjutnya, *stacking gel* dituang diatas *separating gel* yang telah memadat sambil memasang sisir hingga terbentuk gel dan sumurnya. Apabila telah terbentuk gel, maka sisir diangkat dengan hati-hati dan plat dipasang pada alat elektroforesis. Kemudian larutan *running buffer* dituangkan ke dalam bejana elektroforesis.

### 3.4.11 Injeksi Sampel, *Running*, dan Proses Pewarnaan

Diambil 15  $\mu$ L ekstrak kasar hasil isolasi pankreas. Kemudian ditambahkan 15  $\mu$ L *Reducing Sample Buffer* (RSB), dan dipanaskan pada penangas air dengan temperatur 100 °C selama 3 menit lalu sampel didinginkan. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel dengan volume 9  $\mu$ L pada tiap sumur, namun pada salah satu sumur diisi dengan protein standar marker. Setelah itu, anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas lalu keduanya dihubungkan pada *power supply* dengan arus listrik sebesar 30 mA dan tegangan sebesar 150 V. Apabila posisi marker berada pada jarak kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel, maka proses ini dapat dihentikan. Setelah proses *running* selesai maka dilakukan pewarnaan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit sambil dikocok menggunakan *shaker*. Selanjutnya, larutan *staining* diganti dengan larutan *destaining* untuk merendam dan dikocok menggunakan *shaker* hingga gel jernih.

### 3.4.12 Penentuan Berat Molekul

Tahap terakhir yaitu membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan protein marker, sehingga dapat diketahui jenis-jenis protein dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai  $R_f$  (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dengan rumus [45]:

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi protein}}{\text{panjang gel}}$$

Kemudian dibuat kurva standar, dengan sumbu  $x = R_f$  dan sumbu  $Y = \log BM$ , lalu diplotkan didapatkan persamaan garis  $y = ax + b$ . Kemudian nilai  $x$  diganti dengan nilai  $R_f$  sampel sehingga diketahui berat molekulnya.

### 3.4.13 Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas enzim protease dianalisis menggunakan Analisis Ragam *One Way ANOVA* dan di uji lanjutan dengan BNJ  $\alpha = 0,05$  sedangkan data analisis yang diperoleh dari SDS PAGE dianalisis dengan analisa deskriptif.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Aktivitas Enzim Protease pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ

Ekstrak etanol akar pletekan yang diperoleh dari maserasi 900 g bubuk akar pletekan menggunakan pelarut etanol : aquades (1: 1) adalah 284,4 g dengan randemen sebesar 31,6%, berupa ekstrak kental berwarna cokelat. Kadar air dan kadar abu dalam ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) adalah 0,1% dan 10,54 %. Ekstrak etanol akar pletekan diidentifikasi LCMS (**Lampiran F**) menunjukkan adanya senyawa fitosterol (kampesterol, stigmasterol, dan  $\beta$ -sitosterol).

*Streptozotocin* (STZ) merupakan senyawa *diabetagonic* yang bersifat toksik sehingga dapat merusak sel  $\beta$  pankreas. Injeksi dengan cara dosis berulang (*Multiple Low Doses, MLD-STZ*) secara *intraperitoneal* (IP) dilakukan selama 5 hari berturut-turut dengan dosis sebesar 20 mg/kgBB. Injeksi STZ terhadap tikus putih menyebabkan tikus putih menderita Diabetes Melitus (DM) tipe 1 akibat kerusakan sel  $\beta$  pankreas. Tikus putih yang menderita diabetes melitus tipe 1 ditandai dengan meningkatnya kadar glukosa darah.

Berdasarkan Tabel (**Lampiran G**) pada kelompok positif terjadi kenaikan kadar glukosa darah yang didasarkan pada kontrol negatif sebesar 303,72 %. Kemudian pada masing-masing terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB terjadi penurunan kadar glukosa darah berturut-turut sebesar 54,56%, 37,70% dan 16,79%. Hal ini disebabkan senyawa fitosterol (kampesterol, stigmasterol, dan  $\beta$ -sitosterol ) dapat berpotensi sebagai antioksidan. Didukung dengan adanya hasil uji antioksidan (**Lampiran E**) bahwa ekstrak etanol akar pletekan memiliki nilai  $IC_{50}$  dibawah 50  $\mu$ g/mL. Selain itu fitosterol mampu mengaktivasi GLUT4 menyebabkan kadar glukosa berkurang. GLUT4 adalah protein yang berfungsi mentransfer glukosa kedalam sel sehingga kadar glukosa dalam darah menurun [46].

Penurunan dan atau peningkatan kadar glukosa berpengaruh pada aktivitas protease. Satu unit aktivitas protease dinyatakan sebagai  $\mu$  mol (*micro* mol) tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh protease hasil isolasi organ pankreas tikus tiap menit pada kondisi tertentu. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversi nilai absorbansi menjadi konsentrasi tirosin dengan menggunakan kurva baku tirosin dengan  $\lambda$  275 nm menggunakan spektrofotometri UV.

Kelompok negatif atau dalam keadaan normal, enzim protease berfungsi membantu proses apoptosis. Sel akan mengalami apoptosis setelah menjalani masa hidup tertentu. Apoptosis adalah mekanisme kematian sel secara terprogram. Protein pada sel yang rusak atau mati mungkin tidak dibutuhkan lagi karena sudah tidak berfungsi. Protein tersebut akan didegradasi oleh enzim protease. Degradasi protein merupakan proses menjaga sel atau pemeliharaan sel dimana protein yang tidak diinginkan atau rusak diurai menjadi asam amino dan dapat digunakan kembali sehingga terjadi regenerasi sel [47].

**Tabel 4.1** Aktivitas protease tikus kelompok negatif, positif, terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease ( $\mu$ mol/mL.menit)	Aktivitas Protease (%)	
		Peningkatan terhadap kontrol negatif	Penurunan terhadap kontrol positif
Negatif	$0,021 \pm 0,004^a$	-	-
Positif	$0,071 \pm 0,005^e$	238,09	
Terapi 250 mg/kgBB	$0,034 \pm 0,005^b$	-	52,11
Terapi 375 mg/kgBB	$0,046 \pm 0,002^c$	-	35,21
Terapi 500 mg/kgBB	$0,056 \pm 0,001^d$	-	21,12

Berdasarkan (**Tabel 4.1**) kelompok tikus negatif menunjukkan nilai aktivitas protease sebesar  $0,021 \pm 0,004$  ( $\mu$ mol/mL.menit). Nilai aktivitas protease kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk

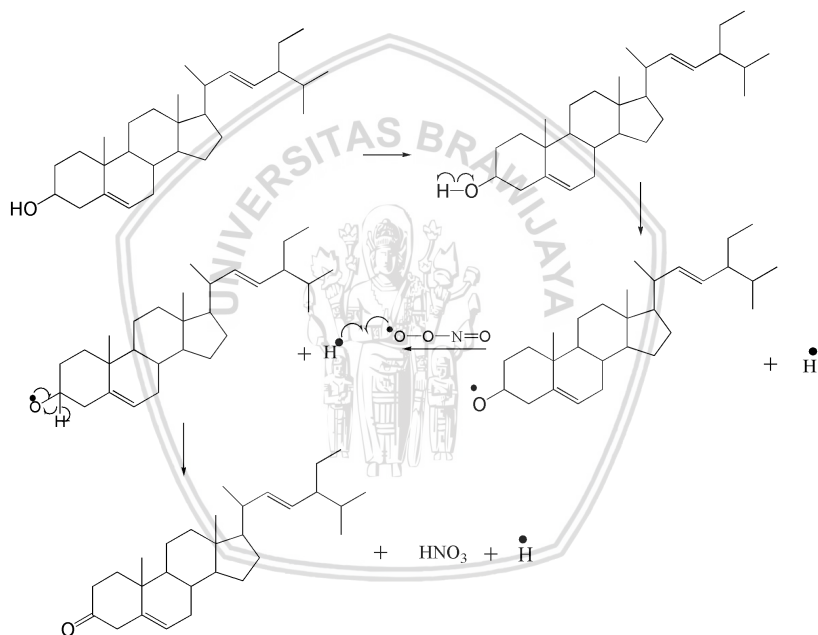
menentukan adanya peningkatan terhadap kontrol positif. Kelompok tikus positif memiliki nilai aktivitas protease yang paling tinggi sebesar  $0,071 \pm 0,005$  ( $\mu\text{mol/mL.menit}$ ). Jika dibandingkan dengan kelompok terapi 250 mg/kgBB sebesar  $0,034 \pm 0,005$  ( $\mu\text{mol/mL.menit}$ ), 375 mg/kgBB sebesar  $0,046 \pm 0,002$  ( $\mu\text{mol/mL.menit}$ ), dan 500 mg/kgBB sebesar  $0,056 \pm 0,001$  ( $\mu\text{mol/mL.menit}$ ). Nilai aktivitas protease kontrol positif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya penurunan terhadap kelompok terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB.

Uji statistik pada (**Lampiran K**) menunjukkan aktivitas protease antar kelompok memiliki varian yang sama (homogen) dengan ( $p>0,05$ ) dan terdistribusi secara normal. Hasil uji *One Way* ANOVA menunjukkan  $F_{hitung} > F_{tabel}$  1% maka diantara perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p<0,01$ ) dengan  $\alpha=5\%$ . Karena terdapat perbedaan, maka diteruskan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur). Hasil analisis *Tukey test* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata antar kelompok. Berdasarkan (**Tabel 4.1**) terjadi kenaikan aktivitas protease sebesar 238,09%.

Peningkatan aktivitas protease sebesar 238,09% tersebut merupakan akibat dari induksi *Streptozotocin* (STZ) yang dapat menyebabkan terjadinya proses inflamasi pada pankreas tikus yang akan mengaktivasi sel-sel *proinflammatory* serta pelepasan enzim protease. STZ merupakan bahan kimia bersifat toksik pada sel  $\beta$  pankreas. *Streptozotocin* memasuki sel  $\beta$  melalui pengangkut glukosa (GLUT2) dan menyebabkan alkilasi DNA (penambahan gugus alkil pada DNA). Kerusakan DNA menginduksi aktivasi poli ADP-ribosilasi, Poli ADP-ribosilasi menyebabkan penipisan  $\text{NAD}^+$  seluler dan ATP. Peningkatan defosforilasi ATP setelah pemberian *Streptozotocin* menghasilkan substrat untuk *xanthine oxidase* yang menghasilkan pembentukan radikal superoksida ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Akibatnya, hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan radikal hidroksil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) juga dihasilkan. Selanjutnya, *Streptozotocin* membebaskan sejumlah nitrit oksida (NO) beracun yang menghambat aktivitas aconitase dan berpartisipasi dalam kerusakan DNA [48]

Munculnya ROS akan mengaktivasi *Nuclear Factor  $\kappa\text{B}$*  (NF- $\kappa\text{B}$ ) merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen inflamasi dan gen-gen imun, yang berperan penting dalam proses inflamasi. NF- $\kappa\text{B}$  berperan dalam meregulasi ekspresi gen-gen imun

dan respon inflamasi, seperti sitokin proinflamasi, kemokin, enzim inflamasi dan molekul adhesi. NF-kB dapat menginduksi sel-sel inflamasi seperti makrofag dan neutrofil yang berfungsi sebagai sel-sel pertahanan kekebalan tubuh. Selain itu, netrofil juga akan melepaskan enzim protease (proteolitik) sebagai respon adanya inflamasi. Aktivitas enzim protease digunakan untuk mengukur tingkat inflamasi. Semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin tinggi tingkat kerusakan jaringan. Oleh sebab itu nilai aktivitas protease kelompok positif lebih tinggi jika dibandingkan kelompok negatif [49]



**Gambar 4.1** Dugaan mekanisme reaksi senyawa fitosterol (stigmasterol) dalam meredam radikal

Aktivitas protease pada kelompok terapi 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB mengalami penurunan masing-masing sebesar 52,11%, 35,21% dan 21,12% terhadap kontrol positif. Penurunan aktivitas protease sejalan dengan penurunan kadar



glukosa, hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol akar pletekan berpotensi sebagai antioksidan yang memberikan pengaruh meredam radikal bebas. Dugaan mekanisme reaksi (**Gambar 4.1**), senyawa stigmasterol akan mengalami pemutusan secara homolitik pada ikatan O-H, kemudian  $H\bullet$  yang terbentuk berikatan dengan radikal ONOO yang diduga berasal dari STZ sehingga radikal teredam menjadi  $HNO_3$ . Namun pada akhir reaksi masih tersisa  $H\bullet$  yang kemungkinan dapat berikatan dengan  $H\bullet$  lain dari reaksi peredaman radikal menggunakan senyawa  $\beta$ -sitosterol atau kampesterol yang diduga akan membentuk  $H_2$ . Sehingga secara sinergis senyawa stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol dan kampesterol dapat meredam radikal bebas. Namun pemberian dosis tinggi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) kurang signifikan dalam menurunkan aktivitas protease, dapat dilihat pada dosis 500 mg/kgBB presentasi penurunan aktivitas protease rendah yaitu 21,12%. Hal ini dapat disebabkan peningkatan dosis terapi ekstrak etanol akar pletekan menyebabkan antioksidan berubah fungsi menjadi prooksidan sehingga dapat merusak sel seperti radikal bebas.

#### **4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Profil Protein pada Pankreas Tikus Putih ( *Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 akibat Induksi MLD-STZ**

Analisa profil protein dengan metode elektroforesis SDS-PAGE pada tikus kelompok negatif DM 1, kelompok positif DM 1, dan kelompok terapi ekstrak etanol akar pletekan dosis 250 mg/kgBB, 375 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB menunjukkan adanya perbedaan pita protein (**Gambar 4.2**) yang selanjutnya diinterpretasikan dalam (**Tabel 4.2**). Pada pita protein kontrol positif terdapat protein baru dengan berat molekul 52 kDa namun pada kontrol negatif, terapi 250 mg/kgBB dan 375 mg/kgBB tidak muncul, kemudian terekspresikan kembali pada dosis 500 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa induksi MLD-STZ dan pemberian terapi ekstrak akar pletekan pada tikus menyebabkan perubahan profil protein pada organ pankreas.



Protein yang terekspresikan pada kontrol positif dengan berat molekul 52 kDa diduga sebagai Hemopexin atau 1B-glycoprotein. Hemopexin (HPX) adalah protein dengan afinitas pengikatan tertinggi terhadap heme bebas dibandingkan dengan protein lainnya. Heme berpotensi sangat beracun karena kemampuannya untuk masuk ke dalam membran lipid dan menghasilkan radikal hidroksil (OH•). Kekuatan pengikatan antara heme dan HPX, dan adanya reseptor heme-HPX mampu mengkatalisis kompleks serta dapat menginduksi aktivitas antioksidan intraseluler sehingga mencegah stres oksidatif [50]. Pada penderita Diabetes Melitus tipe 1 kadar hemopexin meningkat. Hemopexin diekspresikan dalam beberapa sel yang berasal dari jaringan berbeda. Peningkatan konsentrasi glukosa dalam sel akan meningkatkan ekspresi hemopexin. Ekspresi hemopexin terkait dengan stres oksidatif yang diinduksi glukosa [51]

**Tabel 4.2** Berat molekul protein hasil isolasi organ pankreas tikus kelompok negatif, positif, terapi 250 mg/kgBB, 375 kg/mgBB dan 500 mg/kgBB

Kelompok	Berat Molekul Protein (kDa)								
	84	68	63	52	47	34	28	12	11
K-	√	√	√	-	√	√	√	√	√
K+	√	√	√	√	√	√	√	√	√
T1	√	√	√	-	√	√	√	√	√
T2	√	√	√	-	√	√	√	√	√
T3	√	√	√	√	√	√	√	√	√



sehingga berperan dalam melindungi jaringan akibat stres oksidatif. HSP juga dapat menghambat kematian sel. Ekspresi HSP dapat dipicu beberapa hal diantaranya adanya logam-logam berat, kenaikan temperatur, senyawa toksik dan gangguan radikal bebas. [52-53]

Protein dengan berat molekul 52 kDa diduga sebagai protein yang muncul akibat induksi STZ (*Streptozotocin*) yang terjadi pada kontrol positif. *Streptozotocin* adalah sejenis glukosa toksik yang secara khusus terakumulasi dalam sel beta pankreas melalui transporter glukosa GLUT2. Mekanisme efektor beracun dari STZ dimulai dengan produk yang terdekomposisi dan terbentuknya radikal bebas yang bertindak sebagai donor Nitrogen Oksida (NO) menyebabkan peningkatan ROS. Meningkatnya ROS menyebabkan terjadinya stres oksidatif [20]. Meningkatnya radikal bebas menyebabkan antioksidan enzimatis endogen tidak dapat menyeimbangkan radikal bebas dalam jumlah berlebih sehingga radikal bebas dapat merusak jaringan.

Pada kelompok terapi 250 mg/kgBB dan 375 mg/kgBB profil pita protein dengan berat molekul 52 kDa tidak terekspresikan karena kandungan fitosterol sebagai antioksidan. Antioksidan yang berasal dari luar tubuh disebut antioksidan non enzimatis. Adanya fitosterol dalam ekstrak akar pletekan dapat meredam radikal bebas sehingga mencegah stres oksidatif dan mampu memperbaiki inflamasi. Namun pada dosis 500 mg/kgBB pita protein dengan berat molekul 52 kDa terekspresikan hal ini menunjukkan bahwa dosis 500 mg/kgBB kurang efektif memberikan pengaruh pada perbaikan profil protein.

## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan :

1. Pemberian terapi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) sebanyak 3 mL selama 21 hari pada tikus dengan dosis 250 mg/kgBB menurunkan aktivitas protease sebesar sebesar 52,11%, dosis 375 mg/kgBB sebesar 35,21% dan dosis 500 mg/kgBB sebesar 21,12%.
2. Hasil analisa protein menggunakan metode SDS-PAGE menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dosis 250 dan 375 mg/kgBB dapat memberikan pengaruh hilangnya protein berat molekul 52 kDa yang diduga sebagai protein Hemopexin dan dapat digolongkan dalam HSP40 pada kontrol positif.

### 5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk optimasi dosis ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dari dosis 125-375 mg/kgBB sebagai terapi penyakit DM tipe 1 dan perlu ditentukan LD<sub>50</sub>

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kementerian Kesehatan RI. (2014). *Situasi dan Analisis Diabetes*. Pusat Data dan Informasi. Jakarta Selatan.
- [2] WHO. (2018). *Country and Regional Data on Diabetes*, [http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/). Diakses tanggal 09 Februari 2018.
- [3] Leroith, D., S.I. Taylor, J.M. Olefsky. (2004). *Diabetes Mellitus A Fundamental and Clinical Text Third Edition*. USA : Lippincott Williams & Walkins.
- [4] Lukiati,B., S. I. Maslikah dan Nugrahaningsih. (2016). Potensi Ekstrak Etanol Labu Siam (*Sechium Edule*) untuk Perbaikan Kerusakan Sel Beta Pankreas dan Kadar Nitrogen Oksida Pada Tikus Yang Mengalami Diabetes Melitus. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 10(1), 24-27.
- [5] Nugroho, A.E. (2006). Hewan Percobaan Diabetes Melitus : Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas*, 7(4), 378-382.
- [6] Saudek, C.D and Simeon M. (2007). *John Hopkins Medicine*. Baltimore Meryland.
- [7] Robertson, R.Paul, J.Harmon, P.O.Tran, Y.Tanaka, H. Takahashi.(2003). Glucose Toxicity in  $\beta$ -Cell : Type 2 Diabetes Good Radicals Gone Bad and Glutathione Connection. *J.Diabetes*, 52(1), 581-587.
- [8] Cenac, N. (2007). Role for Protease Activity in Visceral Pain in Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3),636-647.
- [9] Hyeronimus,S.B. (2006). *Ragam dan Khasiat Tanaman Obat*. Jakarta : Agromedia.

- [10] Arirudran, B., A. Saraswathy, V.Krishnamurthy. (2011). Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole Plant), *PharmacognosyJournal*, 3(22), 29-34.
- [11] Rizhikovs,J. J. Zandersons, G. Dobeles, A. Paze. (2015). Isolation of Triterpene-rich Extract from Outer Birch Bark by Hot Water and Alkaline Pre-treatment or The Appropriate Choice of Solvent, *Industrial Crops and Product*, 76(1), 209-214.
- [12] Utami, E.T., R.Fitrianti, Mahriani, S.Fajariyah. (2009). Efek Kondisi Hiperglikemik terhadap Struktur Ovarium dan Siklus Estrus pada Mencit ( *Mus Musculus* L.), *Jurnal Ilmu Dasar*, 10(2) , 219-224.
- [13] American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 33(1), 562-569.
- [14] Ozougwu, J. C, Obimba K. C., Belonwu C. D, Unakalamba, (2013). The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus, *J.Physiol Pathophysiol*, 4(4), 46-57.
- [15] Gusti, K.R. (2016). *Podiatri : Perawatan Luka Akut dan Kronik Diabetik Gangrene Menghindari Amputasi*, Jakarta : Penerbit PT.Bhuana Ilmu Populer Gedia.
- [16] Kurniawan, L.B. (2016). Patofisiologi,Skrining dan Diagnosis Laboratorium Diabetes Melitus Gestasional, *CDK-246*, 43(11) : 811-813.
- [17] Fatimah, R.N. (2015). Diabetes Melitus Tipe 2, *J.Majority*, 4(5) ,93-101.

- [18] Atkinson, M.A. (2012). The Pathogenesis and Natural History Type 1 Diabetes, *Cold Spray Harb Perspect Med* 2(1), 1-18.
- [19] Unal, D, A. Kara, S. Aksak, B. Z.Altunkaynak, S. Yıldırım. (2012). Insulin Hormon : Mechanism and Effect on the Body and Relationship with Central Nervous System, *Dicle Tip Derg/ Dicle Med.J*, 39(2) , 310 -315.
- [20] Goud, Busineni J.,Dwarakanath.V, B.K.Chikka swamy. (2015). Streptozotocin- A Diabetogenic Agent in Animal Models, *Ijppr Human*, 3(1) ,253-269.
- [21] Suryanto E. dan Frenly W. (2009). Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus Altilis F*), *Chem Prog*, 2(1), 1-7.
- [22] Sudiana, I.K. (2008). *Patobiologi Molekul Kanker*. Jakarta : Salemba Medika.
- [23] Joyce L.K and Evelyn R.H. (2014). *Farmokology : A Nursing Process Approach*. Canada : Elsevier Health Science.
- [24] Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Protein dan Aplikasi dalam Kesehatan*. Yogyakarta : Kanisius.
- [25] Chaitanya, B.Khrisna, Atigari, Diana, Vivian, Babu, S.Ravindra, Ravella, Alekhya, Vardhan, Jayasree. (2012). Hypolipidemic and Anti Oxidant Activity of *Ruellia tuberosa* Linn, *International Journal of Pharmacy an Biological Science*, (e-ISSN : 2230-7605).
- [26] Chothani, Daya.L, Patel M.B, Mishra S.H, Vaghasiya. (2010), Review on *Ruellia tuberosa* ( Cracker Plant ), *Phcog*, 12(12), 506-512.

- [27] Mohan, V.R., R.Kumar N, Vasantha K. (2014). GC-MS Analysis of Bioactive Component of Tubers of *Ruellia tuberosa* L. (Achantaceae), *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutic*, 2(2), 209-216.
- [28] Jannah, H, I Made S, dan Yayuk A., (2013). Analisis Senyawa Fitosterol Dalam Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) *Chem. Prog.* 6(2), 70-75
- [29] Pateh, U. U., Haruna A. K., Garba, M., Iliya, I., Sule, I. M., Abubakar, M. S. and Ambi A.A.. (2009). Isolation of stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, and 2-hydroxyhexadecanoid acid methyl ester from rhizomes of *Stylochiton lancifolius*. *Nig. Journ. Pharm. Sci.* 8 (1): 19-25.
- [30] Andayani, Y. (2003). *Mekanisme Aktivitas Antihiperglikemik Ekstrak Buncis (Phaseolus vulgaris Linn) pada Tikus Diabetes dan Identifikasi Komponen Aktif*. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [31] Animal Diversity. (2014). *Rattus Norvegicus* Rat, University of Michigan Museum of Zoology. <http://animaldiversity.org>, Diakses tanggal 03 Februari 2018.
- [32] Don, Linzey and C. Brecht. (2005). *Rattus Norvegicus*, <http://www.discoverlife.org/nh/tx/Vertebrata/Mammalia>, Diakses tanggal 03 Februari 2018.
- [33] Dale, E and Bochman. (2008). *Anatomy of Pankreas*. Department of Cellular Biology and Anatomy Medical College of Georgia.
- [34] John Hopkins Medical. (2018). Pankreas : Anatomy and Function, <https://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary>, Diakses tanggal 03 Februari 2018.
- [35] Robert, J.S and Gerald S. (2008). Pancreatic Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 12(10), 715-724.



- [36] Menon S., Gopalakhrisna, Vallath. (2015). Pankreas and Diabetes Mellitus the Relationship Between The Organ and The Desease, *Journal of The Association of Physicans of India*, 63(1),51-58.
- [37] Sri, Harti A. (2015). *Mikrobiologi Kesehatan : Peran Mikrobiologi dalam Bidang Kesehatan*. Yogyakarta : Pustaka Nasional.
- [38] Aulanni'am, I.P Wati, C.Mahdi. (2013). Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih ( *Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporine-A, *Kimia Student Journal*, 1(2), 257-263.
- [39] Naiola W dan N.Widyastuti. (2007). Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus sp.*, *Berk.Penel Hayati*, 13(1), 51-56.
- [40] Mansur, A., M.C Anderson, M.J. Anderson. (2013). *White Blood Cell*, Encyclopedia Britannica.
- [41] Rani, Y., T. Nugroho, F.Puspita. (2015). Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus sp.* Galur Lokal Riau, *JOM FMIPA*, 1(2), 116-122.
- [42] Lunblad, R.L. (2010). *Approaches to The Conformational Analysis of Biopharmaceuticals*. New York : CRC Press Taylor.
- [43] Wilson .K and John W. (2000). *Principles and Technique of Practical Biochemistry Fifth Edition*. UK : Cambridge University Press.
- [44] Susanto, E. (2010). Penggunaan SDS-PAGE untuk Karakterisasi Fraksi Protein Sebagai Alternatif Metode Identifikasi Pencampuran Daging Babi ke dalam Bakso, *Jurnal Ternak*, 1(1), 1-7.

- [45] Aulanni'am. (2005). *Protein dan Analisisnya*. Malang : Citra Mentari.
- [46] Pon Velayutham Anandh Babu, Dongmin Liu, Elizabeth R. Gilbert. (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24 : 1777–1789.
- [47] Hopskin W.G, dan Norman P.A.H., (2004). Introduction to Plant Physiology 3<sup>rd</sup> Edition. *John Wiley & Sons, Inc.* USA
- [48] T. Szkudelski.( 2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pankreas. *Physiol. Res.* 50,536-546.
- [49] Yamato, M., Y. Kataoka, H.Mizuma, Y. Wada, and Y. Watanabe. (2009). PET and Macro-and Microautoradiographic Studies Combined with Immunohistochemistry for Monitoring Rat Intestinal Ulceration and Healing processes. *The journal of nuclear medicine*. 50(2). Proquest pg. 226.
- [50] Tolosano, E And Fiorella A. (2002). Hemopexin: Structure, Function, and Regulation, *Journal Dna And Cell Biology* 21( 4) : 297–306.
- [51] Chia-Ching Chen. (2012). Hemopexin is up-regulated in plasma from type 1 diabetes mellitus patients: Role of glucose-induced ROS. *Journal Of Proteomics* 75 : 3760–3777
- [52] Rakonczay, Z'N, Jr. Tamataka, Boros, I. Lonovics, J. (2003). Heat Shock Proteins And The Pankreas. *Journal Of Cellular Physiology* 195:383–391
- [53] Kalmar, B., Greensmith, L. (2009) . Induction of Heat Shock Protein for Protections Against Oxidative Stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 : 310-318